

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



Docket No.: 4504-095

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of :
Young-Meng CHIANG : Confirmation No.9753
U.S. Patent Application No. 10/713,029 : Group Art Unit: 1651
Filed: November 17, 2003 : Examiner: n/a
For: NEW METHOD FOR PRODUCING HIGH OD PHYCOERYTHRIN

CLAIM OF PRIORITY AND
TRANSMITTAL OF CERTIFIED PRIORITY DOCUMENT

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

In accordance with the provisions of 35 U.S.C. 119, Applicant hereby claims, in the present application, the priority of Taiwan Patent Applications Nos. TW091133928, TW091133929, TW091133930, TW091133931 filed on November 21, 2002. The certified copy is submitted herewith.

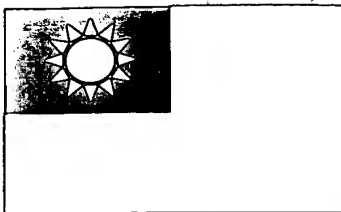
Respectfully submitted,

LOWE HAUPTMAN GILMAN & BERNER, LLP

Kenneth M. Berner

Kenneth M. Berner
Registration No. 37,093

1700 Diagonal Road, Suite 310
Alexandria, Virginia 22314
(703) 684-1111 KMB/iy
Facsimile: (703) 518-5499
Date: March 24, 2004



中華民國經濟部智慧財產局

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE
MINISTRY OF ECONOMIC AFFAIRS
REPUBLIC OF CHINA

茲證明所附文件，係本局存檔中原申請案的副本，正確無訛，
其申請資料如下：

This is to certify that annexed is a true copy from the records of this
office of the application as originally filed which is identified hereunder:

申請日：西元 2002 年 11 月 21 日
Application Date

申請案號：091133928
Application No.

申請人：人字生物科技股份有限公司、呂誌翼
Applicant(s)

局長
Director General

蔡練生

發文日期：西元 2003 年 11 月 24 日
Issue Date

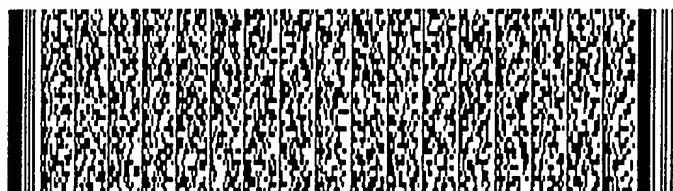
發文字號：09221189880
Serial No.

申請日期：	IPC分類
申請案號：	

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、 發明名稱	中 文	粉紅柱狀的乳節藻用以產製高吸光度藻紅素的新用途
	英 文	New Use of Galaxaura Oblongata for Producing High OD Phycoerythrin
二、 發明人 (共4人)	姓 名 (中文)	1. 江永棉 2. 周宏農 3. 鄭俊明
	姓 名 (英文)	1. Chiang, Young-Meng 2. Chou, Hong-Nong 3. Jeng, Jiunn-Ming
	國 籍 (中英文)	1. 中華民國 TW 2. 中華民國 TW 3. 中華民國 TW
	住居所 (中 文)	1. 台北市舟山路30巷6弄8號 2. 臺北市長興路60-3號4樓 3. 新莊市中和街204巷10號12樓
	住居所 (英 文)	1. 2. 3.
三、 申請人 (共2人)	名稱或 姓 名 (中文)	1. 人宇生物科技股份有限公司 2. 呂誌翼
	名稱或 姓 名 (英文)	1. ZEN-U BIOTECHNOLOGY CO., LTD 2. Lu, Chih-Yi
	國 籍 (中英文)	1. 中華民國 TW 2. 中華民國 TW
	住居所 (營業所) (中 文)	1. 臺北市忠孝東路四段295號5樓 (本地址與前向貴局申請者相同) 2. 嘉義縣中埔鄉和興村14鄰中華路897號 (本地址與前向貴局申請者相同)
	住居所 (營業所) (英 文)	1. 2.
	代表人 (中文)	1. 王宇睦 2.
	代表人 (英文)	1. 2.



申請日期：	IPC分類
申請案號：	

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、 發明名稱	中文	
	英文	
二、 發明人 (共4人)	姓名 (中文)	4. 呂誌翼
	姓名 (英文)	4. Lu, Chih-Yi
	國籍 (中英文)	4. 中華民國 TW
	住居所 (中文)	4. 嘉義縣中埔鄉和興村14鄰中華路897號
	住居所 (英文)	4.
三、 申請人 (共2人)	名稱或 姓名 (中文)	
	名稱或 姓名 (英文)	
	國籍 (中英文)	
	住居所 (營業所) (中文)	
	住居所 (營業所) (英文)	
	代表人 (中文)	
	代表人 (英文)	



四、中文發明摘要 (發明名稱：粉紅柱狀的乳節藻用以產製高吸光度藻紅素的新用途)

粉紅柱狀的乳節藻用以產製高吸光度藻紅素的新用途

本發明是有關於發現粉紅柱狀的乳節藻(*Galaxaura oblongata*)可以得到具有高吸光度(OD)比值藻紅素的一種新用途。利用粉紅柱狀的乳節藻生活史中具有有性生殖、無性生殖與營養繁殖三個世代交替及果孢子絲狀體階段不含各種膠類的特徵下，在控制之光線、溫度、營養條件下，延續其絲狀體階段，並進一步以之為材料，萃取高吸光度比值藻紅素。

伍、(一)、本案代表圖為：第 七 C 圖

(二)、本案代表圖之元件代表符號簡單說明：

陸、英文發明摘要 (發明名稱：New Use of *Galaxaura Oblongata* for Producing High OD Phycoerythrin)

New Use of *Galaxaura Oblongata*
for Producing High OD Phycoerythrin

The invention relates to a new use of *Galaxaura oblongata* for producing high OD phycoerythrin. It has been found that *Galaxaura oblongata* has three generations in the life cycle : sexual reproduction, asexual reproduction



四、中文發明摘要 (發明名稱：粉紅柱狀的乳節藻用以產製高吸光度藻紅素的新用途)

陸、英文發明摘要 (發明名稱：New Use of Galaxaura Oblongata for Producing High OD Phycoerythrin)

and vegetative propagation. Then, carpospore filamentous plants thereof do not contain gel and can be maintained under some controlled conditions. The invention takes advantage of these findings to provide a new use for producing high OD phycoerythrin from carpospore filamentous phase of Galaxaura oblongata.



一、本案已向

國家(地區)申請專利

申請日期

案號

主張專利法第二十四條第一項優先權

二、☐主張專利法第二十五條之一第一項優先權：

申請案號：

日期：

三、主張本案係符合專利法第二十條第一項☐第一款但書或☐第二款但書規定之期間

日期：

四、☐有關微生物已寄存於國外：

寄存國家：

寄存機構：

寄存日期：

寄存號碼：

☐有關微生物已寄存於國內(本局所指定之寄存機構)：

寄存機構：

寄存日期：

寄存號碼：

☐熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。



五、發明說明 (I)

[發明所屬之技術領域]

本發明係有關於發現粉紅柱狀的乳節藻(*Galaxaura oblongata*)的一種新用途，特別是針對發現粉紅柱狀的乳節藻可以得到具有高吸光度(OD)比值藻紅素的一種新用途。

[先前技術]

不論就藻紅素、藻藍素或其他天然蛋白質色素而言，通常具有實用安全性，對熱、酸鹼度等亦具相當程度的穩定性，可應用於食品與化妝品上，同時亦可作為免疫學上抗體標誌用的螢光色素而應用於臨床診斷及細胞生化學研究上。目前市場已開發並應用的有藻藍素(phycoerythrin)與藻紅素(phycoerythrin)，由於藻藍素生產之原料來源多為可予大量繁殖培養的藍綠藻，如螺旋藻(*Spirulina*)與銅鑷微囊藻(*Microcystis*)，且其培養與產製方法多享有專利。而藻紅素則因原料的缺乏、或因原物料不利色素產製，而產量少、價格昂貴。對全球每年數萬磅食用紅色色素的需求，一個天然、安全、穩定又具特殊螢光釋出的紅色色素是必要的，預估大量生產後，價格下降，更會擴大其應用範圍與市場供給。



五、發明說明 (2)

目前藻紅色素蛋白大部分分離自紅藻之大型葉狀體，如紫菜(*Porphyra*)、仙菜藻(*Ceramium*)等，少部分則萃取自可大量控制培養的紫球藻(*Porphyridium*)。

目前雖有野生大量紅藻資源及栽培之紫菜作為藻紅色素原料，但因多數紅藻含豐富膠質物(洋菜膠、鹿角菜膠、紅藻膠)導致色素之萃出不易，尤其是乾燥後之藻類原料更是如此，再加上野生藻種的原料在質、量上均有季節性差異，為人力所不易掌握。

目前紫球藻的培養於收集細胞時亦有顯著的困難，因單細胞藻體的收集一向是耗能而耗時的動作，影響生產成本甚大而藻細胞於培養時所分泌的可溶性多醣類，除了阻礙細胞的收集外，亦影響到色素的抽取。

為了解決上述的問題，美國專利5,358,858提出了一種由頭髮菜(*Bangia atropurpurea*)及狹葉紫菜(*Porphyra angusta*)絲狀體產製藻紅色素的方法，利用頭髮菜及狹葉紫菜生活史中之絲狀孢子體階段不含各種膠類的特徵下，利用控制之光線、溫度、營養條件下，延續其絲狀體階段，並進一步以之為材料，萃取藻紅色素，其步驟如下：

1. 絲狀體之培養與繁殖，從野外採集成熟的頭髮菜或狹葉紫菜配子體，以滅菌海水及毛筆清洗藻體乾淨，稍陰乾後投入含改良過之SWM-III(如表一所示)培養皿中，培養



五、發明說明 (3)

皿內底部鋪有蓋玻片，待孢子釋放並附著於蓋玻片後，在室溫下，1000lux~4000lux之照度及每日10~16小時照光之培養箱中發芽成長，最後發育呈分歧多枝之絲狀孢子體。

表一 SWM- III

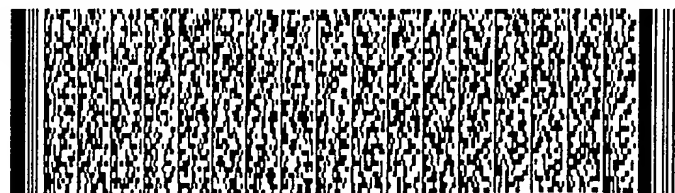
NaNO ³	8.5 g/100 ml	取2ml
Na ² HPO ⁴	0.595 g/100 ml	取2ml
Na ² EDTA	0.5 g/100 ml	取2ml
	0.01625 g/100 ml	取2ml
FeCl ³ (or FeCl ³ · 7H ² O)	0.02885 g/100 ml	2ml
*PI-metal		2ml
**S-3 Vitamins		2ml
Soil extract		50ml
Tris	(10 cc/l)	500mg
Liver extract		10mg
Sea Water	up to pH=7.5	1l

(調pH時：先以濃HCl調至pH≤7，再以適當濃度之NaOH調至pH7.5，如此可免於消毒時產生白色沉澱)

*PI-metal

H³BO³ 12.368 g

MnCl² 1.385 g



五、發明說明 (4)

ZnCl ²	0.109 g	再蒸餾水21
CoCl ² · 6H ² O	4.479 mg	
CuCl ² · 2H ² O	0.034 mg	

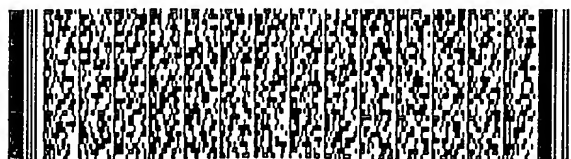
**S-3 Vitamins

Thiamin HCl	0.5 g	
Capantothenate	0.1 g	
Nicotinic acid	0.1 g	
P-aminobenzoic acid	10 mg	
Biotin	1 mg	再蒸餾水21
Inositol	5 g	
Folic acid	2 mg	
Thymine	3 mg	
B ¹²	1 mg	

(所有的Stock溶液均存於褐色瓶中，冷藏保存)

2. 絲狀體刮下後移至含培養液之三角瓶，在上述生長環境條件下培養，育成絲狀體之聚集團。打碎絲狀體之聚集團，移至更大生長之量瓶繼續發育成更多之聚集團，並因此漸次擴大培養之體積，在較大體積之照光培養槽中，應予打氣(每分鐘300毫升乾淨空氣)大量繁殖培養。藉100~400網目之網布過濾，濾除之培養液可回收再使用，對後續之培養並無妨礙。

3. 藻體收穫後，因絲狀體結構可經真空或溫風迅速乾



五、發明說明 (5)

燥，再研磨成粉後，以水或磷酸鹽溶液予以充分攪拌萃取、離心，可得澄清之深紅藻蛋白溶液，藻色素的濃縮與純化，可藉20%硫酸銨溶液去除部分雜質蛋白沉澱，再於溶液中經60%~65%硫酸銨溶液沉澱出色素蛋白，為 $OD^{565}/OD^{280} = 1.4 \sim 1.6$ 的粗紅色色素，為食品級、化妝品可用之色素。

4. 將沉澱之蛋白進一步藉膠濾層析純化(gel filtration)，使用Sephadex G200樹酯分離，第一道程序可得OD比為3.3~3.7的藻紅素產品，再次重複即可得OD比為5.1~5.2的藻紅素，再經膠體電泳法(SDS)電泳所得之結果顯示純度約99%，可作為免疫檢驗用試劑。

上述的方法雖然可以避免傳統紫菜、仙菜藻萃取色素法需以加熱及分離膠值之複雜手續，或是紫球藻等單細胞植物萃取法由於其體積小導致收集的困難與其分泌的多醣類影響色素的抽取之問題，但是頭髮菜及狹葉紫菜絲狀體直接形成之深紅藻蛋白溶液，其 OD^{565}/OD^{280} 只有1.4~1.6，仍需進行藻色素的濃縮與純化來獲取高OD值的藻紅素，因此我們需要發現其他藻種之絲狀體，其初次形成之深紅藻蛋白溶液就具有高OD值的藻紅素。

[發明內容]



五、發明說明 (6)

鑒於上述之發明背景中，習知利用頭髮菜及狹葉紫菜絲狀體直接形成之深紅藻蛋白溶液，其吸光度比值偏低的問題。本發明發現粉紅柱狀的乳節藻可以得到具有高吸光度比值藻紅素的一種新用途，避免上述情形產生。

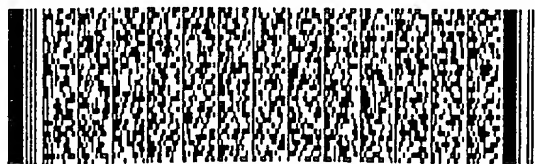
本發明的一個目的，在於發現粉紅柱狀的乳節藻用以得到藻紅素的一種新用途。藉由其單位重量含有藻紅素的高重量比值，達到降低單位成本的目的。

本發明的又一個目的，在於發現粉紅柱狀的乳節藻用以得到藻紅素的一種新用途。藉由其可萃取具有高吸光度比值藻紅素，達到減少藻紅素純化步驟的目的。

根據以上所述之目的，本發明發現一種藻種之新用途，其生活史具有有性生殖、無性生殖與營養繁殖三個世代交替，利用其孢子絲狀體以產製高吸光度比值之藻紅素。

根據上述構想，其中該孢子絲狀體為果孢子(carpospore)絲狀體。

根據上述構想，其中該藻種為粉紅柱狀的乳節藻(*Galaxaura oblongata*)，從其果孢子絲狀體中萃取之藻紅素經高效能液相層析儀所得出之565nm之層析光譜圖如



五、發明說明 (7)

專利說明書第七圖B所示。

根據上述構想，其中該粉紅柱狀的乳節藻果孢子絲狀體產製高吸光度比值之藻紅素，包含下列步驟：以培養液培養粉紅柱狀的乳節藻含成熟果孢子囊之配子體並得到果孢子；將該果孢子置於 $15\sim 30^{\circ}\text{C}$ 下， $500\text{lux}\sim 6000\text{lux}$ 之照度與明暗比為 $10:14$ 以上之環境下培養，使其長成為絲狀體；收集該絲狀體；加入酸鹼緩衝液，加以攪拌、離心，以得到深色色素蛋白溶液；及以鹽析法去除該深色色素蛋白溶液中雜質並沉澱出色素蛋白。

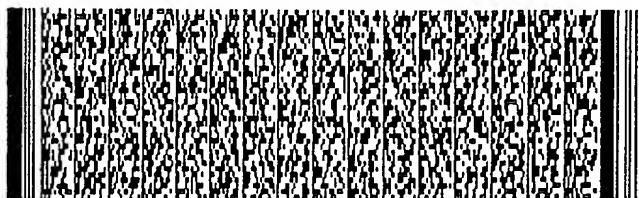
根據上述構想，其中該培養液為SWM-III培養液。

根據上述構想，其中該SWM-III培養液為去有機物之SWM-III培養液。

根據上述構想，其中培養該果孢子絲狀體的方法為旋浮培養法。

根據上述構想，其中培養之環境為 20°C ， 2000lux 之照度與明暗比為 $12:12$ 。

根據上述構想，其中收集該絲狀體的步驟更包含：以網布收集法收集該絲狀體；乾燥該絲狀體；及研磨該絲狀



五、發明說明 (8)

體，使其成為粉末。

根據上述構想，其中網布收集法使用20~400網目網布。

根據上述構想，其中乾燥該絲狀體的方法為真空法。

根據上述構想，其中乾燥該絲狀體的條件為溫風法。

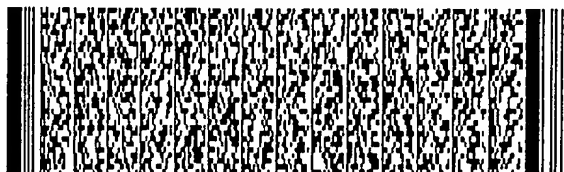
根據上述構想，其中離心的的條件為轉速6000rpm、時間10min及溫度4℃。

根據上述構想，其中該酸鹼緩衝液為磷酸鉀溶液，以維持溶液pH值在5~10之間。

根據上述構想，其中鹽析法去除雜質為加入20%硫酸銨溶液。

根據上述構想，其中鹽析法沉澱色素蛋白為加入60%~65%硫酸銨溶液。

根據上述構想，其中更包含以超過濾法(ultrafiltration)純化分離出藻紅素。



五、發明說明 (9)

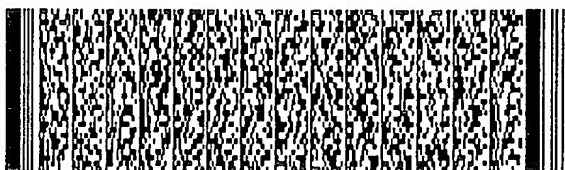
根據上述構想，其中更包含以膠濾層析法純化分離出藻紅素。

根據上述構想，其中膠濾層析法為使用Sephadex G200之膠濾層析法。

根據以上所述之目的，本發明發現一種使用生活史具有有性生殖、無性生殖與營養繁殖三個世代交替之藻種之果孢子(carpospore)絲狀體以產製高吸光度比值之藻紅素之設備，包含：一第一培養槽，具有培養液培養粉紅柱狀的乳節藻(*Galaxaura oblongata*)含成熟果孢子囊之配子體並得到果孢子；一第二培養槽，具有500lux~6000lux之照度與明暗比為10:14以上與15~30℃下之環境下，用以培養該果孢子，使其成長成絲狀體；一收集器，用以收集該絲狀體；一研磨器，用以研磨該絲狀體；一攪拌器，加入酸鹼緩衝液與研磨後該絲狀體，用以得到一深色色素蛋白溶液；一沉澱器，從該深色色素蛋白溶液沉澱出藻紅素。

根據上述構想，其中從粉紅柱狀的乳節藻之果孢子絲狀體中萃取之藻紅素經高效能液相層析儀所得出之565nm之層析光譜圖如專利說明書第七圖B所示。

根據上述構想，其中該培養液為SWM-III培養液。



五、發明說明 (10)

根據上述構想，其中該SWM-III培養液為去有機物之SWM-III培養液。

根據上述構想，其中培養該果孢子絲狀體的方法為旋浮培養法。

根據上述構想，其中培養之環境為 20°C ， 2000lux 之照度與明暗比為 $12:12$ 。

根據上述構想，其中收集器利用網布收集該絲狀體。

根據上述構想，其中該網布為 $20\sim 400$ 網目網布。

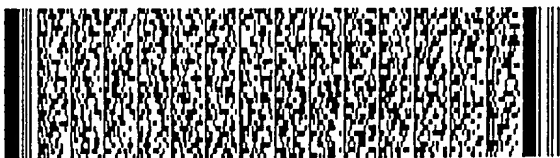
根據上述構想，其中該研磨器更包含一乾燥器。

根據上述構想，其中乾燥器為真空乾燥器。

根據上述構想，其中乾燥器為溫風乾燥器。

根據上述構想，其中該沉澱器係使用鹽析法沉澱藻紅素。

根據上述構想，其中該鹽析法沉澱藻紅素為加入 $60\%\sim 65\%$ 硫酸銨溶液。



五、發明說明 (11)

根據上述構想，其中更包含一純化器，藉由膠濾層析法純化該藻紅素。

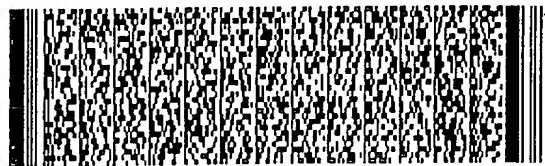
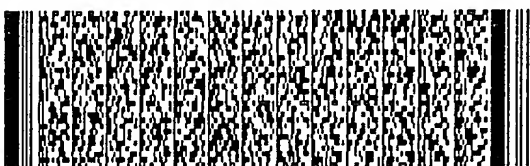
根據上述構想，其中膠濾層析法為使用Sephadex G200之膠濾層析法。

根據上述構想，其中更包含一純化器，藉由超過濾法(ultrafiltration)純化該藻紅素。

[實施方式]

本發明的較佳實施例會詳細描述如下。然而，除了詳細描述外，本發明還可以廣泛地在其他的實施例施行，且本發明的範圍不受限定，其以之後的專利範圍為準。

藻膽蛋白是來自藻類體內的一種水溶性螢光蛋白色素。因具有特殊的螢光性質，目前主要被廣泛的運用於流動細胞儀的螢光試劑上。各種藻膽蛋白中，藻紅素是其中的一種，亦是天然物中螢光強度最高的一種，因此有許多螢光檢測方法採用此類色素，第一圖為藻紅素利用高效能液相層析儀(HPLC)得出之UV吸收及螢光發散層析光譜圖，其層析條件如下所述：



五、發明說明 (12)

HPLC column: HYDROCELL DEAE NP10

Column size: 50*4.6mm

Buffer A: 10mMK-PBS pH6.0

Buffer B: 10mMk-PBS , 0.5M NaCl pH6.0

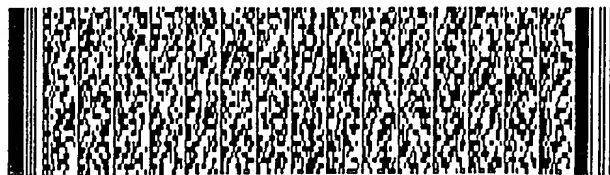
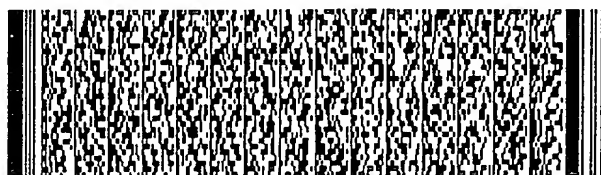
Gradient: 0% Buffer B → 12min → 50% Buffer B

Detection: 565nm

Flow rate: 1ml/min

而高效能液相層析儀主要由高精密度高壓幫浦、分離管、偵測儀和記錄器所組成。

觀察頭髮菜生活史(如第二圖所示)及狹葉紫菜生活史(如第三圖所示)中,我們可以得知上述兩種藻類的生活史一般是有性生殖及無性生殖兩個世代交替,有性生殖為產生造果器(雌配子體)與精子(雄配子體)的配子體,當雌配子體受精之後,會發育成果孢子囊,裡面的果孢子成熟後,即會散出,變成絲狀孢子體。無性生殖則是由單孢子直接萌發成小型藻體,等到一定時候又可產生單孢子,單孢子又萌發成小型藻體,如此循環一直到適當的環境條件下,小型藻體所產生的單孢子就可萌發成大型藻體。同時,小型藻體也能轉變成大型藻體,再進入有性生殖世代。而習知技藝就是利用絲狀孢子體階段不含各種膠類的特徵,在控制之光線、溫度、營養條件下,延續其絲狀體階段,並進一步以之為材料,萃取藻紅素。

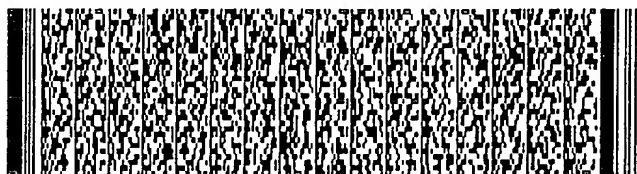


五、發明說明 (13)

藻類的生活史除了是以有性生殖及無性生殖兩個世代交替外，另外部分藻類還多出一個營養繁殖世代，即產生四分孢子的孢子體(即四分孢子體)，其過程為造果器受精後形成果孢子體(carposporephyte)、果孢子(carpospore)、四分孢子體(tetrasporophyte)、四分孢子囊(tetrasporangium)、最後是四分孢子(tetraspore)，其中果孢子與四分孢子都會萌發成絲狀體，但此兩種絲狀體的特性不同，請參考海麵(Nemalion)生活史(如第四圖所示)。同樣地，本發明就是利用具有營養繁殖世代的粉紅柱狀的乳節藻，其果孢子絲狀體階段不含各種膠類的特徵，在控制之光線、溫度、營養條件下，延續其絲狀體階段，並進一步以之為材料，萃取出具有高OD值藻紅素，其步驟如下：

1. 絲狀體之培養與繁殖，將成熟的粉紅柱狀的乳節藻含成熟果孢子囊之配子體，以滅菌海水及毛筆清洗藻體乾淨，稍陰乾後投入不含有機物之SWM-III培養液之培養器中，培養器內底部鋪有玻璃片，待果孢子(carpospore)釋放並附著於玻璃片後，在15~30℃下，500lux~6000lux之照度，明暗比為10:14以上及每日10以上照光之培養器中發芽成長，最後發育呈分歧多枝之絲狀體。

2. 絲狀體刮下後移至含培養液之大型培養槽，在上述生長環境條件下培養，可育成絲狀體之疏鬆小聚集團，並因此漸次擴大培養之體積，在較大體積之照光培養槽中，



五、發明說明 (14)

應予打氣使該小聚集團懸浮於培養液中(稱為旋浮培養)大量繁殖培養。藉20~400網目之網布過濾，濾除之培養液可回收再使用，對後續之培養並無妨礙。

3. 藻體收穫後，因絲狀體結構可經真空或溫風迅速乾燥，再經自動磨粉機研磨成粉後，取2.4公克重之粉末，加入70毫升、10mM之磷酸鉀溶液或其他酸鹼緩衝液予以充分攪拌，以維持溶液pH值在5~10之間予以充分攪拌、再以6000rpm、10min、4℃之狀態下離心，可得澄清之深紅藻蛋白溶液。藻色素的濃縮與純化，可藉20%硫酸銨溶液去除部分雜質蛋白沉澱，再於溶液中經60%~65%硫酸銨溶液沉澱出色素蛋白，其為 $OD^{565}/OD^{280} = 2.66$ 的粗紅色色素，為食品級、化妝品可用之色素。上述澄清之深紅藻蛋白溶液也可以用直接收穫之濕藻體磨碎加磷酸鉀溶液後再離心取得，而藻色素的濃縮與純化可藉由超過濾法(ultrafiltration)來進行。

4. 將沉澱之蛋白進一步藉膠濾層析純化(gel filtration)，使用120公分長之Sephadex G200樹酯分離，第一道程序可得OD比為4.5以上的藻紅素產品，再次重複即可得OD比為5.3以上藻紅素，再經膠體電泳法(SDS)電泳所得之結果顯示純度約99%，可作為免疫檢驗用試劑。

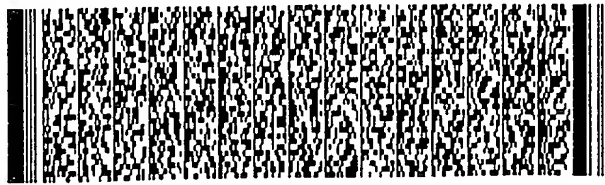
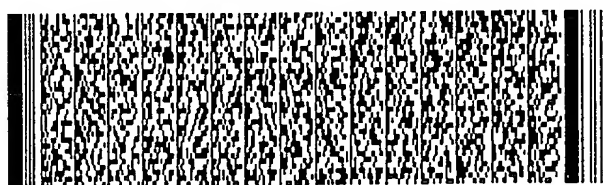
第五A~C圖為從頭髮菜萃取出之純質藻紅素經高效能液相層析儀(HPLC)所得出之280nm、565nm、615nm之層析



五、發明說明 (15)

光譜圖，第六A~C圖則為從狹葉紫菜萃取出之純質藻紅素經高效能液相層析儀所得出之280nm、565nm、615nm之層析光譜圖。實際上，從不同的藻種中所萃取出之藻紅素，其經高效能液相層析儀所得出層析光譜圖亦有所差異，就像人類的手指指紋一般。因此，我們可以藉此一特性來分辨出藻紅素是由何種藻種所產製。第七A~C圖即是本發明從粉紅柱狀的乳節藻取出之純質藻紅素經高效能液相層析儀所得出之280nm、565nm、615nm之層析光譜圖。

表二為習知之頭髮菜、狹葉紫菜與本發明之粉紅柱狀的乳節藻萃取藻紅素之比較表。第一列為單位藻類重量(克)含藻紅素重量(毫克)之比值，代表在相同的藻類重量下可以產出的藻紅素，我們可以清楚得知本發明之粉紅柱狀的乳節藻，其含藻紅素的比值為最高。第二、三列為從藻種中萃取出藻紅素之吸光度比值(OD^{565}/OD^{280})及(OD^{615}/OD^{565})，前者表示藻紅素和其他蛋白質純度的比例，後者表示藻藍素和藻紅素的純度比，(OD^{565}/OD^{280})比值越高表示藻紅素純度越高，其附加價值越高，越具食品或化妝品色素利用價值，也越有利後端製成純化，因可應用於醫療之免疫檢驗用試劑上；而因為藻藍素會吸收藻紅素所發出的螢光，造成作為在食品或化妝品色素用途時螢光演色不佳，因此(OD^{615}/OD^{565})越低表示藻藍素含量越少，在螢光演色效果上更佳。同樣地，我們可以明顯看出本發明之粉紅柱狀的乳節藻，其萃取出藻紅素具有最高之吸光度比



五、發明說明 (16)

值。因此，利用本發明之粉紅柱狀的乳節藻絲狀體來萃取藻紅素，其較習知頭髮菜、狹葉紫菜之絲狀體，具有高藻紅素含量與高吸光度比值之優點。

表二 各藻種藻粉色素成份分析

藻種	Ba	Pa	Go
RPE mg / g 藻粉	53.5	38.89	57.74
吸光比值A565/A280	1.40	1.54	2.66
吸光比值A615/A565	0.19	0.53	0.14

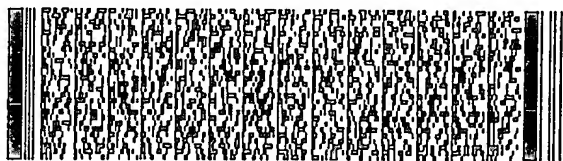
RPE：一種藻紅蛋白，具親水性並在水與形成穩定性水溶液，其最大UV吸收波長及螢光發散波長各為566nm及575nm。

Ba：頭髮菜(*Bangia atropurpurea*)

Pa：狹葉紫菜(*Porphyra angusta*)

Go：粉紅柱狀的乳節藻(*Galaxaura oblongata*)

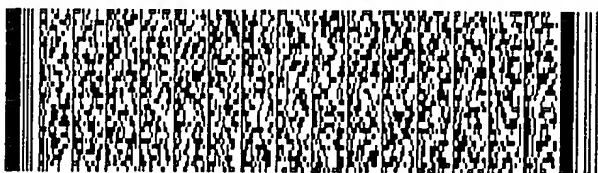
綜上所述，本發明實施例卻能達到所預期之功效，又其所揭露之具體構造，不僅未曾見諸於同類產品中，亦未曾公開於申請前，誠已完全符合專利法之規定與要求，爰



五、發明說明 (17)

依法提出發明專利之申請，懇請惠予審查，並賜准專利，則實感德便。

即使本發明係藉由舉出一個較佳實施例來描述，但是本發明並不限定於所舉出之實施例。先前雖舉出與敘述之特定實施例，但是顯而易見地，其它未脫離本發明所揭示之精神下，所完成之等效改變或修飾，均應包含在本發明之申請專利範圍內。此外，凡其它未脫離本發明所揭示之精神下，所完成之其他類似與近似改變或修飾，也均包含在本發明之申請專利範圍內。同時應以最廣之定義來解釋本發明之範圍，藉以包含所有的修飾與類似結構。



圖式簡單說明

[圖 式 簡 單 說 明]

為使本發明使用之技術手段、發明特徵、達成目的及功效易於明白了解，茲配合圖式及圖式符號詳細說明如下：

第一圖繪示的是利用高效能液相層析儀(HPLC)得出之藻紅素UV吸收及螢光發散層析光譜圖；

第二圖繪示的是頭髮菜生活史；

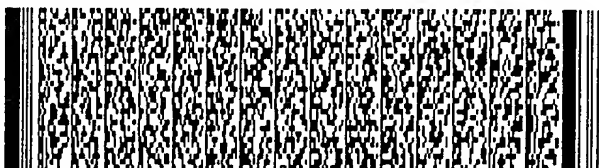
第三圖繪示的是狹葉紫菜生活史；

第四圖繪示的是海麵生活史；

第五A~C圖繪示的是頭髮菜萃取出之純質藻紅素經高效能液相層析儀所得出之280nm、565nm、615nm之層析光譜圖。

第六A~C圖繪示的是狹葉紫菜萃取出之純質藻紅素經高效能液相層析儀所得出之280nm、565nm、615nm之層析光譜圖。

第七A~C圖繪示的是粉紅柱狀的乳節藻萃取出之純質藻紅素經高效能液相層析儀所得出之280nm、565nm、615nm之



圖式簡單說明

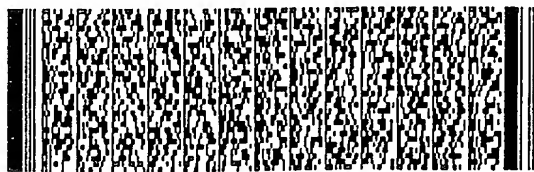
層析光譜圖。



六、申請專利範圍

申請專利範圍：

1. 一種藻種之新用途，其生活史具有有性生殖、無性生殖與營養繁殖三個世代交替，利用其孢子絲狀體以產製高吸光度比值之藻紅素。
2. 如申請專利範圍第1項所述藻種之新用途，其中該孢子絲狀體為果孢子(carpospore)絲狀體。
3. 如申請專利範圍第2項所述藻種之新用途，其中該藻種為粉紅柱狀的乳節藻(*Galaxaura oblongata*)，從其果孢子絲狀體中萃取之藻紅素經高效能液相層析儀所得出之565nm之層析光譜圖如專利說明書第七圖B所示。
4. 如申請專利範圍第3項所述之粉紅柱狀的乳節藻新用途，其中該粉紅柱狀的乳節藻果孢子絲狀體產製高吸光度比值之藻紅素，包含下列步驟：
 - 以培養液培養粉紅柱狀的乳節藻含成熟果孢子囊之配子體並得到果孢子；
 - 將該果孢子置於15~30℃下，500lux~6000lux之照度與明暗比為10:14以上之環境下培養，使其長成為絲狀體；
 - 收集該絲狀體；
 - 加入酸鹼緩衝液，加以攪拌、離心，以得到深色色素



六、申請專利範圍

蛋白溶液；及

以鹽析法去除該深色色素蛋白溶液中雜質並沉澱出色素蛋白。

5. 如申請專利範圍第4項之粉紅柱狀的乳節藻新用途，其中該培養液為SWM-Ⅲ培養液。
6. 如申請專利範圍第5項之粉紅柱狀的乳節藻新用途，其中該SWM-Ⅲ培養液為去有機物之SWM-Ⅲ培養液。
7. 如申請專利範圍第4項之粉紅柱狀的乳節藻新用途，其中培養該果孢子絲狀體的方法為旋浮培養法。
8. 如申請專利範圍第4項之粉紅柱狀的乳節藻新用途，其中培養之環境為20℃，2000lux之照度與明暗比為12:12。
9. 如申請專利範圍第4項之粉紅柱狀的乳節藻新用途，其中收集該絲狀體的步驟更包含：
以網布收集法收集該絲狀體；
乾燥該絲狀體；及
研磨該絲狀體，使其成為粉末。
10. 如申請專利範圍第9項之粉紅柱狀的乳節藻新用途，其中網布收集法使用20~400網目網布。



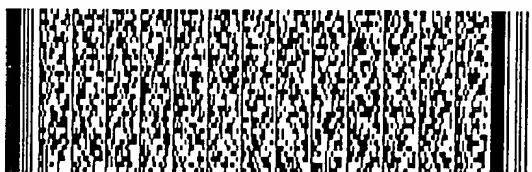
六、申請專利範圍

11. 如申請專利範圍第9項之粉紅柱狀的乳節藻新用途，其中乾燥該絲狀體的方法為真空法。
12. 如申請專利範圍第9項之粉紅柱狀的乳節藻新用途，其中乾燥該絲狀體的條件為溫風法。
13. 如申請專利範圍第4項之粉紅柱狀的乳節藻新用途，其中離心的的條件為轉速6000rpm、時間10min及溫度4℃。
14. 如申請專利範圍第4項之粉紅柱狀的乳節藻新用途，其中該酸鹼緩衝液為磷酸鉀溶液，以維持溶液pH值在5~10之間。
15. 如申請專利範圍第4項之粉紅柱狀的乳節藻新用途，其中鹽析法去除雜質為加入20%硫酸銨溶液。
16. 如申請專利範圍第4項之粉紅柱狀的乳節藻新用途，其中鹽析法沉澱色素蛋白為加入60%~65%硫酸銨溶液。
17. 如申請專利範圍第4項之粉紅柱狀的乳節藻新用途，其中更包含以超過濾法(ultrafiltration)純化分離出藻紅素。



六、申請專利範圍

18. 如申請專利範圍第4項之粉紅柱狀的乳節藻新用途，其中更包含以膠濾層析法純化分離出藻紅素。
19. 如申請專利範圍第18項之粉紅柱狀的乳節藻新用途，其中膠濾層析法為使用Sephadex G200之膠濾層析法。
20. 一種使用生活史具有有性生殖、無性生殖與營養繁殖三個世代交替之藻種之果孢子(carpospore)絲狀體以產製高吸光度比值之藻紅素之設備，包含：
- 一第一培養槽，具有培養液培養粉紅柱狀的乳節藻(*Galaxaura oblongata*)含成熟果孢子囊之配子體並得到果孢子；
 - 一第二培養槽，具有500lux~6000lux之照度與明暗比為10:14以上與15~30℃下之環境下，用以培養該果孢子，使其成長成絲狀體；
 - 一收集器，用以收集該絲狀體；
 - 一研磨器，用以研磨該絲狀體；
 - 一攪拌器，加入酸鹼緩衝液與研磨後該絲狀體，用以得到一深色色素蛋白溶液；
 - 一沉澱器，從該深色色素蛋白溶液沉澱出藻紅素。
21. 如申請專利範圍第20項之產製高吸光度比值之藻紅素之設備，其中從粉紅柱狀的乳節藻之果孢子絲狀體中萃取



六、申請專利範圍

之藻紅素經高效能液相層析儀所得出之565nm之層析光譜圖如專利說明書第七圖B所示。

22. 如申請專利範圍第20項之使用粉紅柱狀的乳節藻絲狀體產製高吸光度比值之藻紅素之設備，其中該培養液為SWM-III培養液。

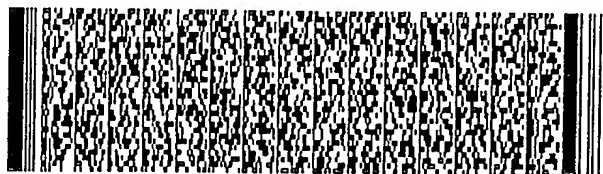
23. 如申請專利範圍第22項之使用粉紅柱狀的乳節藻絲狀體產製高吸光度比值之藻紅素之設備，其中該SWM-III培養液為去有機物之SWM-III培養液。

24. 如申請專利範圍第20項之使用粉紅柱狀的乳節藻絲狀體產製高吸光度比值之藻紅素之設備，其中培養該果孢子絲狀體的方法為旋浮培養法。

25. 如申請專利範圍第20項之使用粉紅柱狀的乳節藻絲狀體產製高吸光度比值之藻紅素之設備，其中培養之環境為20℃，2000lux之照度與明暗比為12:12。

26. 如申請專利範圍第20項之使用粉紅柱狀的乳節藻絲狀體產製高吸光度比值之藻紅素之設備，其中收集器利用網布收集該絲狀體。

27. 如申請專利範圍第26項之使用粉紅柱狀的乳節藻絲狀



六、申請專利範圍

體產製高吸光度比值之藻紅素之設備，其中該網布為20~400網目網布。

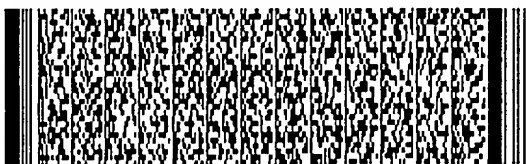
28. 如申請專利範圍第20項之使用粉紅柱狀的乳節藻絲狀體產製高吸光度比值之藻紅素之設備，其中該研磨器更包含一乾燥器。

29. 如申請專利範圍第28項之使用粉紅柱狀的乳節藻絲狀體產製高吸光度比值之藻紅素之設備，其中乾燥器為真空乾燥器。

30. 如申請專利範圍第28項之使用粉紅柱狀的乳節藻絲狀體產製高吸光度比值之藻紅素之設備，其中乾燥器為溫風乾燥器。

31. 如申請專利範圍第20項之使用粉紅柱狀的乳節藻絲狀體產製高吸光度比值之藻紅素之設備，其中該沉澱器係使用鹽析法沉澱藻紅素。

32. 如申請專利範圍第31項之使用粉紅柱狀的乳節藻絲狀體產製高吸光度比值之藻紅素之設備，其中該鹽析法沉澱藻紅素為加入60%~65%硫酸銨溶液。

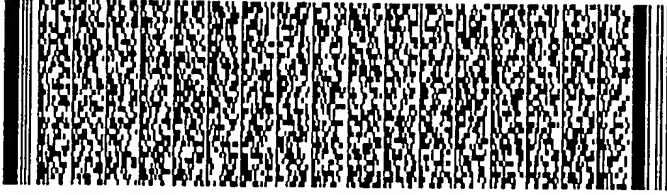


六、申請專利範圍

33. 如申請專利範圍第20項之使用粉紅柱狀的乳節藻絲狀體產製高吸光度比值之藻紅素之設備，其中更包含一純化器，藉由膠濾層析法純化該藻紅素。
34. 如申請專利範圍第33項之使用粉紅柱狀的乳節藻絲狀體產製高吸光度比值之藻紅素之設備，其中膠濾層析法為使用Sephadex G200之膠濾層析法。
35. 如申請專利範圍第20項之使用粉紅柱狀的乳節藻絲狀體產製高吸光度比值之藻紅素之設備，其中更包含一純化器，藉由超過濾法(ultrafiltration)純化該藻紅素。



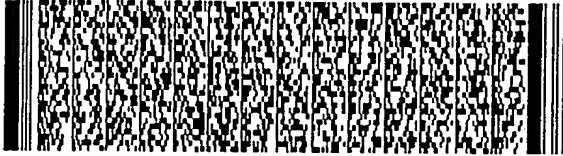
第 1/31 頁



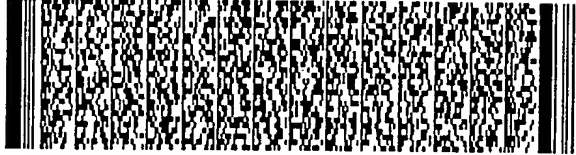
第 2/31 頁



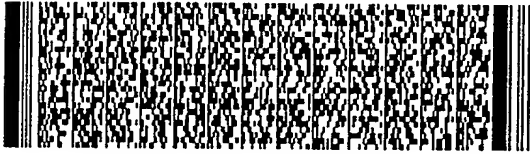
第 3/31 頁



第 3/31 頁



第 4/31 頁



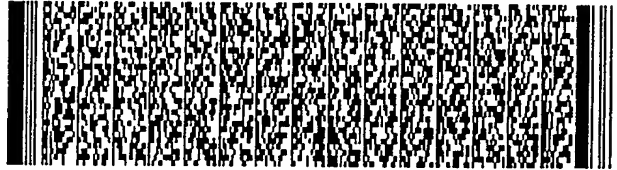
第 5/31 頁



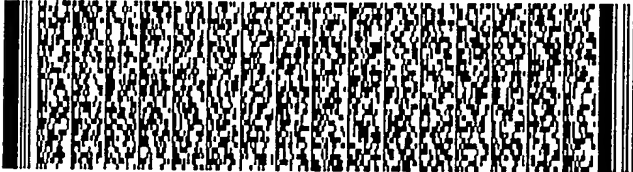
第 6/31 頁



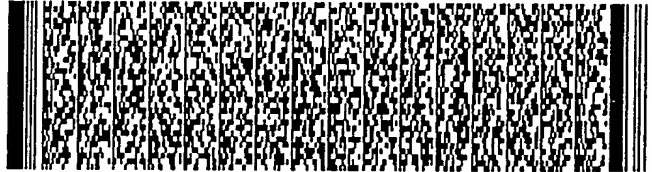
第 6/31 頁



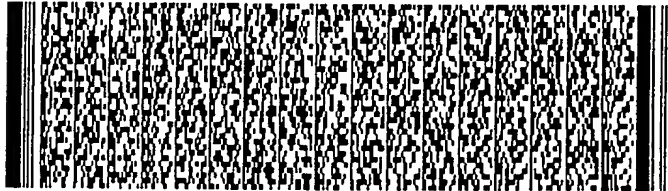
第 7/31 頁



第 7/31 頁



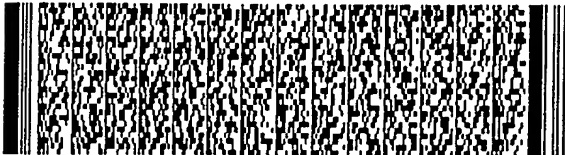
第 8/31 頁



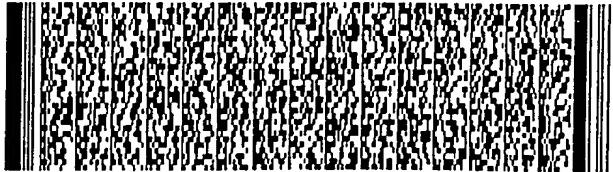
第 9/31 頁



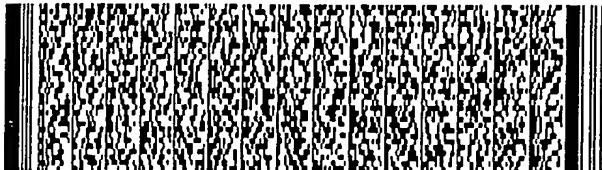
第 9/31 頁



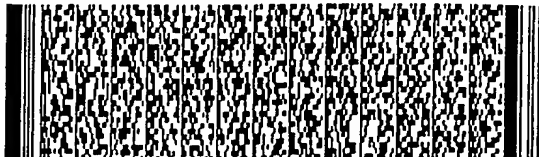
第 10/31 頁



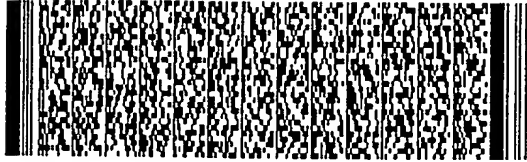
第 10/31 頁



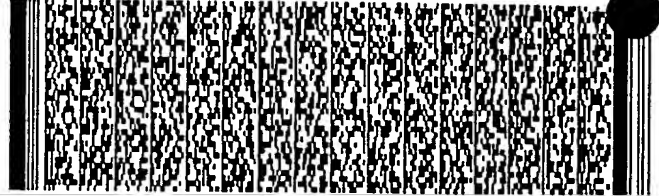
第 11/31 頁



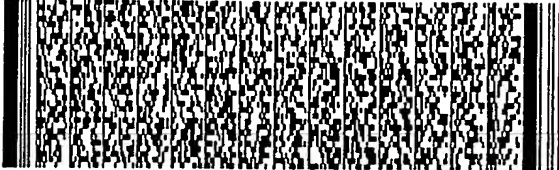
第 11/31 頁



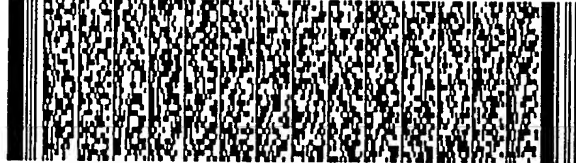
第 12/31 頁



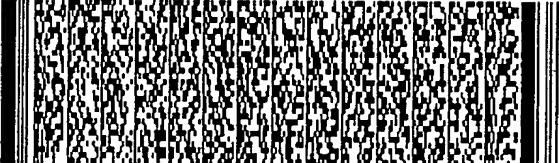
第 13/31 頁



第 14/31 頁



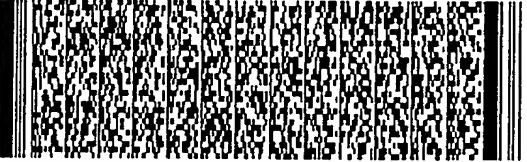
第 14/31 頁



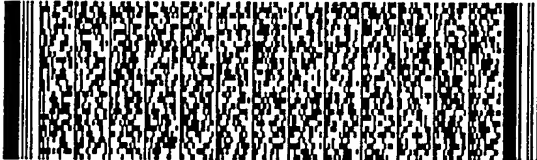
第 15/31 頁



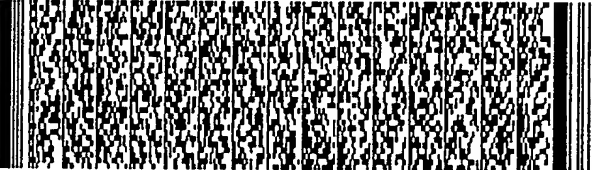
第 16/31 頁



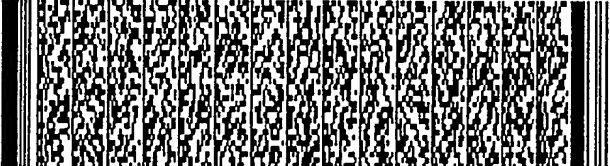
第 16/31 頁



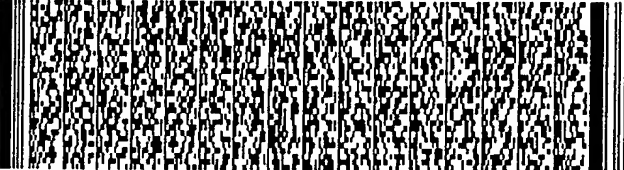
第 17/31 頁



第 17/31 頁



第 18/31 頁



第 18/31 頁



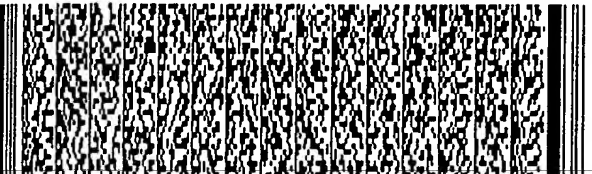
第 19/31 頁



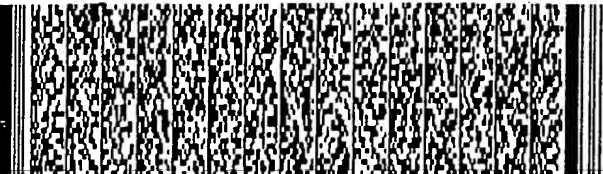
第 19/31 頁



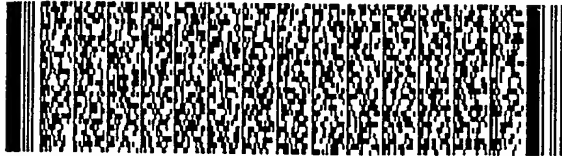
第 20/31 頁



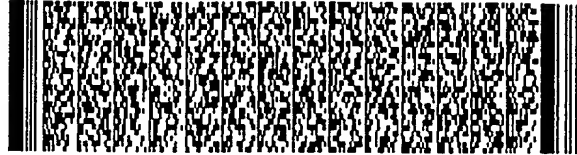
第 20/31 頁



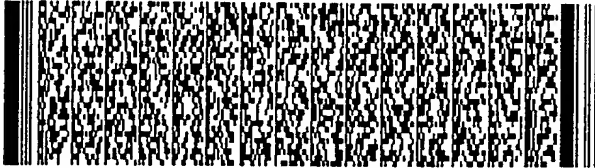
第 21/31 頁



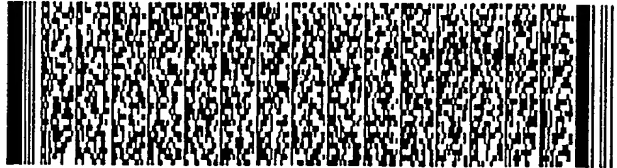
第 21/31 頁



第 22/31 頁



第 23/31 頁



第 24/31 頁



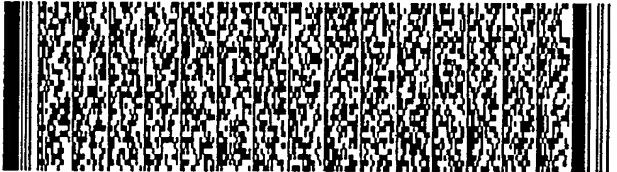
第 25/31 頁



第 25/31 頁



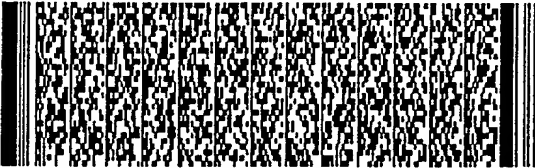
第 26/31 頁



第 27/31 頁



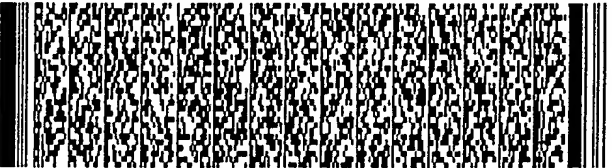
第 28/31 頁



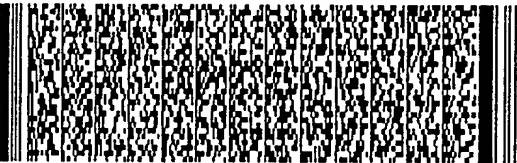
第 28/31 頁



第 29/31 頁



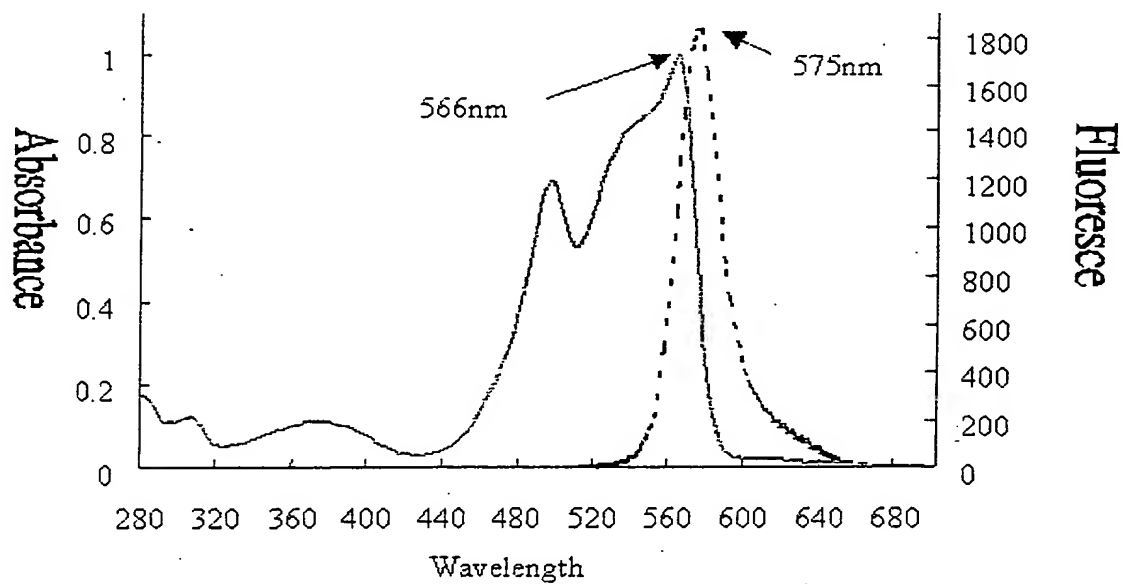
第 30/31 頁



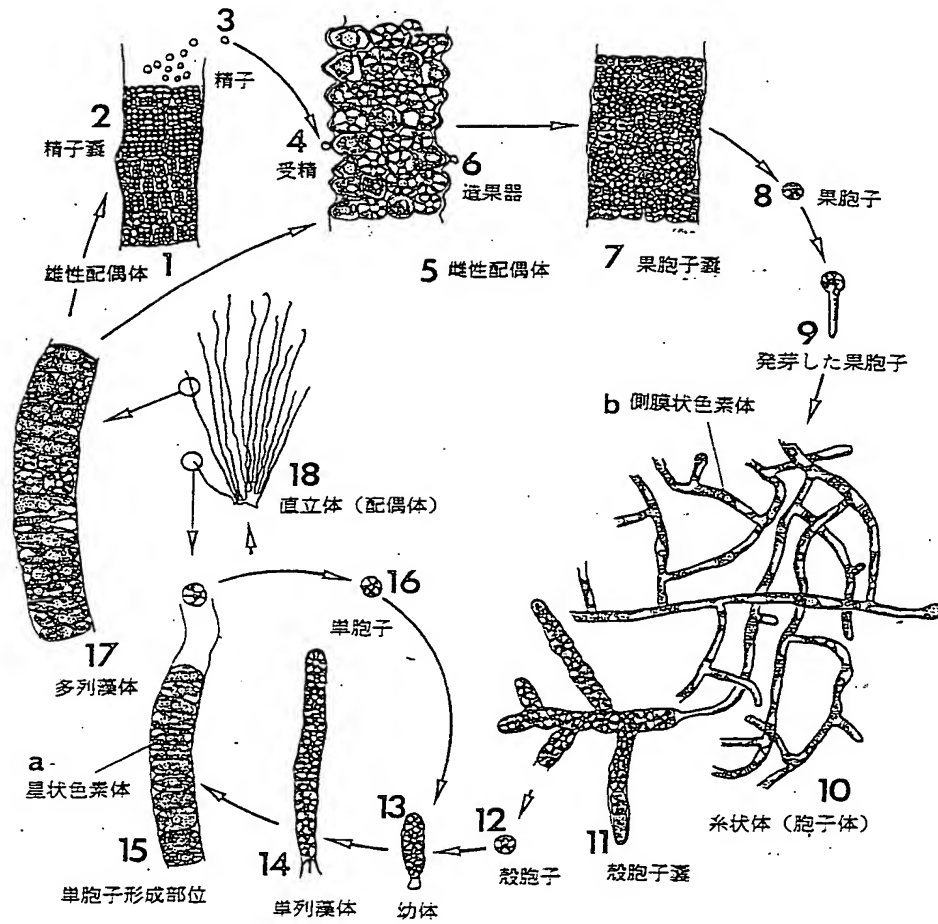
第 31/31 頁



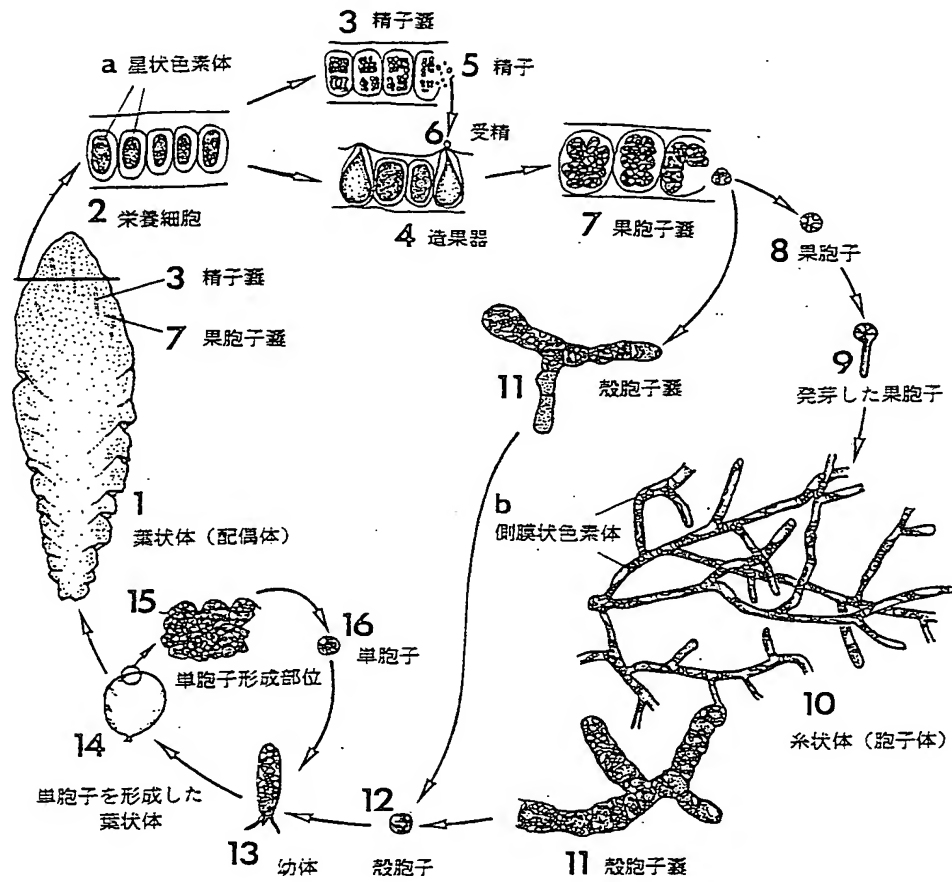
圖式



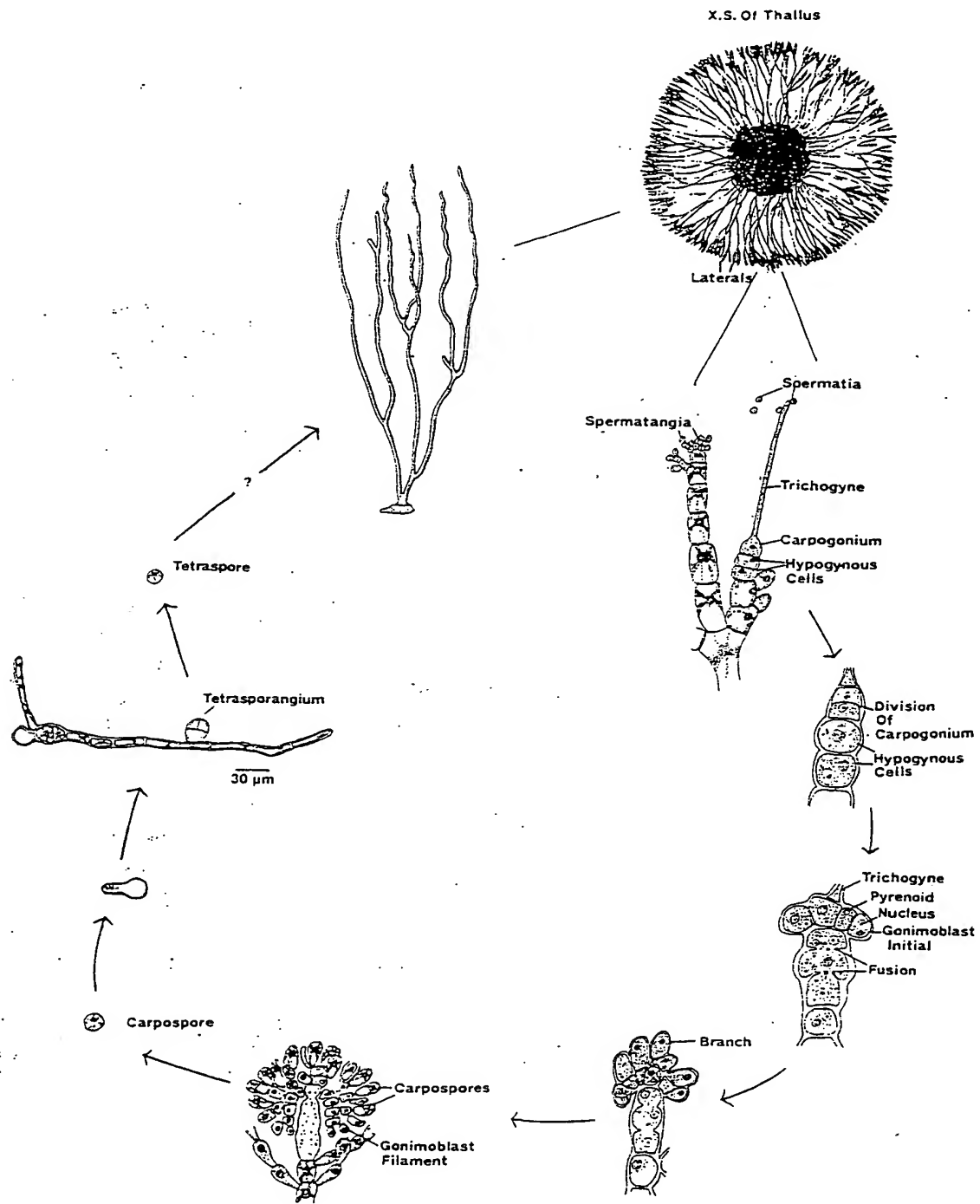
第一圖



第 二 圖

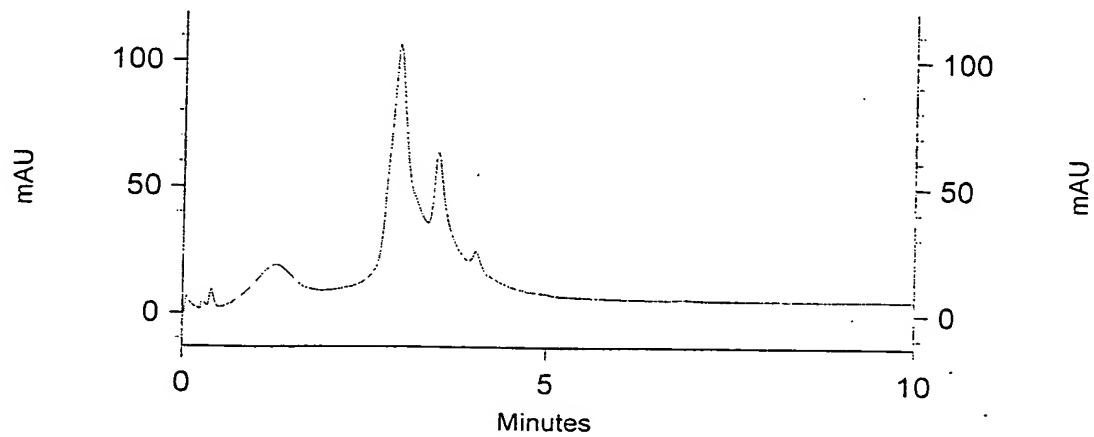


第三圖



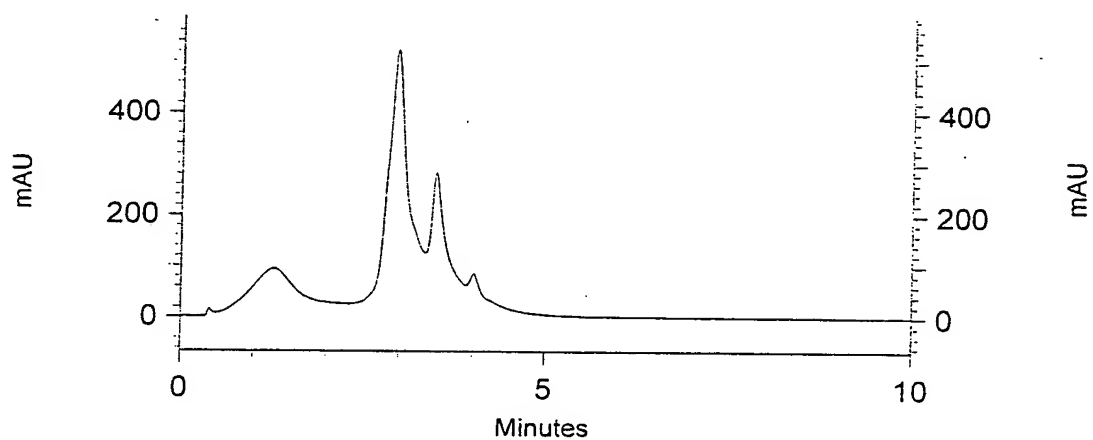
第 四 圖

圖式



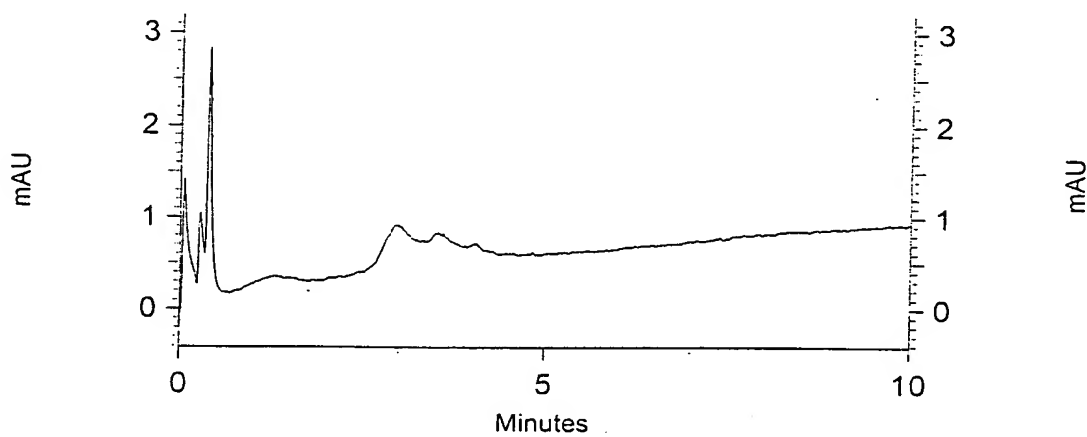
Detector : 280nm

第五 A 圖



Detector : 565nm

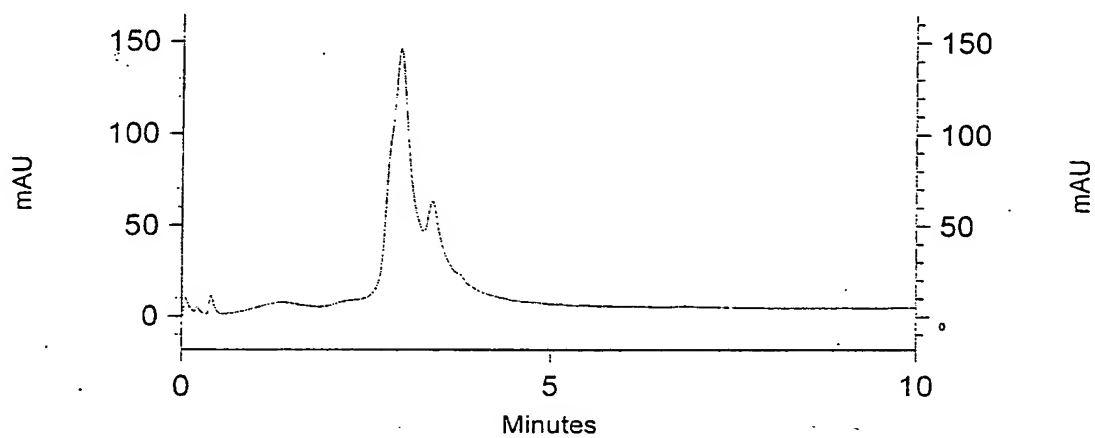
第五 B 圖



Detector : 615nm

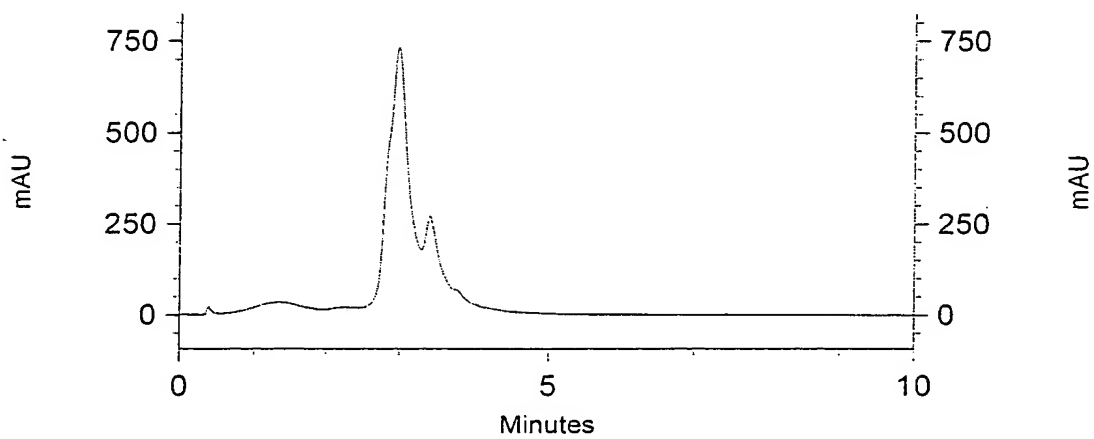
第五 C 圖

圖式



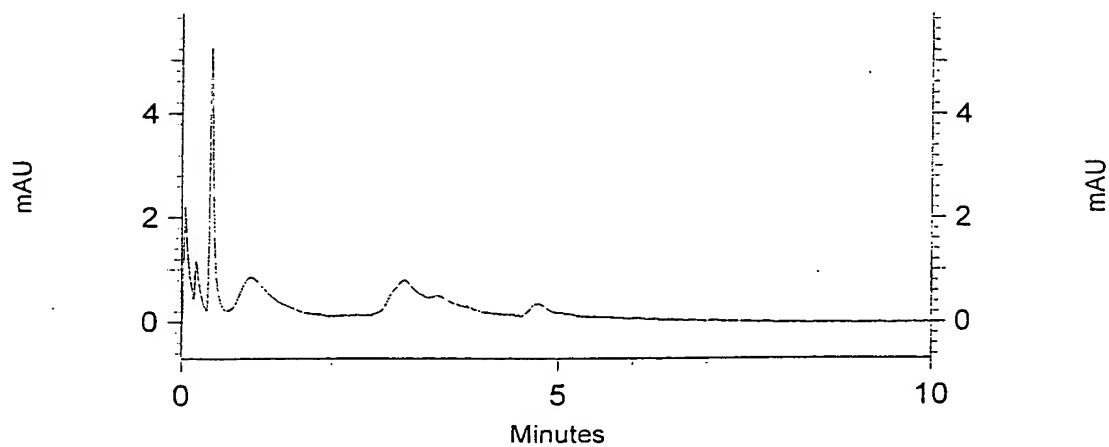
Detector : 280nm

第六 A 圖



Detector : 565nm

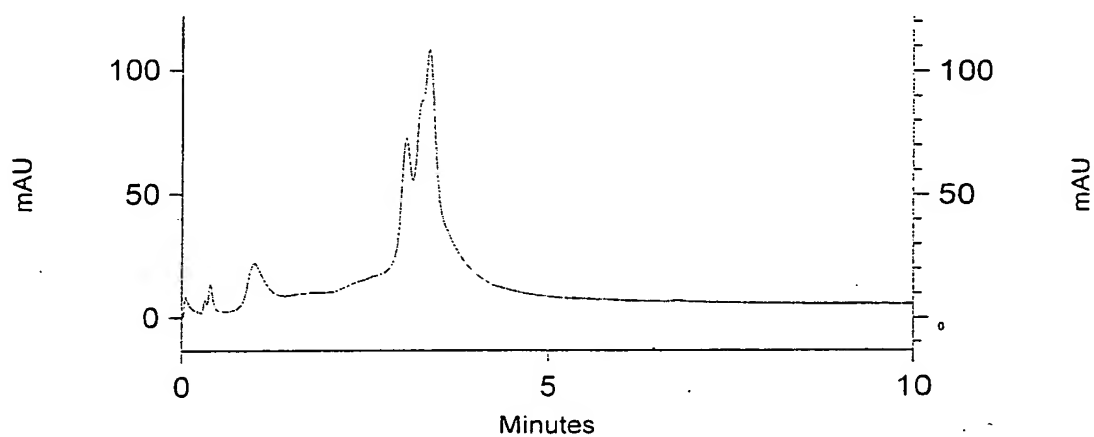
第六 B 圖



Detector : 615nm

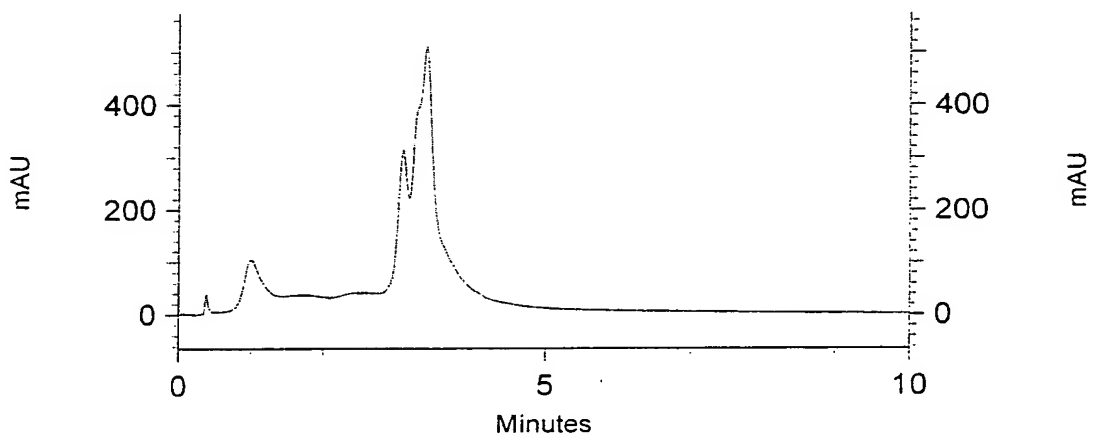
第六 C 圖

圖式



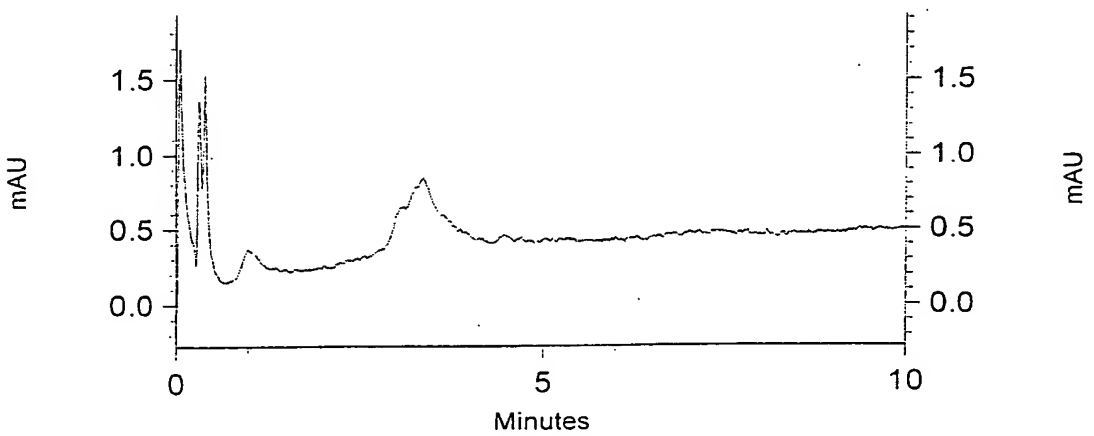
Detector : 280nm

第七 A 圖



Detector : 565nm

第七 B 圖



Detector : 615nm

第七 C 圖